

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН

относно: дисертационен труд на Ваня Димитрова Младенова от ИБИР-БАН

на тема: „ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ МИТОХОНДРИАЛНИЯ СТАТУС В ЯЙЧНИЦИ И ЕПИГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ В ООЦИТИ НА СУПЕРОВУЛИРАЛИ МИШКИ, ПОЛУЧАВАЛИ КОМБИНИРАНА БИОДОБАВКА“

за получаване на образователна и научна степен „Доктор“, по научна специалност: “Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването” (04.02.01),

назначена в състава на Научното жури със Заповед № 89/16.07.2019 г. на Директора на ИБИР-БАН, проф. дбн Сорен Хайрабемян.

Ваня Младенова е родена през 1985 г. в гр. Сливница. През 2014 г. завършва Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ със специалност антропология. Постъпва на работа в Института по биология и имунология на размножаването през ноември 2011 г., като специалист-биолог, където работи до момента. Била е редовен докторант в периода 2015-2017 г., след което е отчислена с право на защита в края на 2017 г.

Дисертационният труд на Ваня Младенова е посветен на проблем от съществено значение за изработване на подходящи стратегии за подобряване на репродуктивния потенциал при животните. Въпросите свързани с ефекта на качеството на храната върху репродуктивните възможности третира три приоритета с национално и международно значение – репродуктивно здраве, качество на храни и опазване на околната среда. В дисертацията на Ваня Младенова се преплитат първите две приоритета, което несъмнено отразява нейното съвременно измерение. Трудът се простира с широк обхват от организмови до молекулярно-биологични изследвания при използване на класически и най-съвременни методи.

Дисертационният труд е написан на общо 129 страници и е структуриран по общоприетия начин с разпределение на отделните раздели, както следва: Въведение – 1 стр.; Литературен обзор - 47 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 21 стр.; Собствени резултати и дискусия – 42 стр.; Заключение – 3 стр.; Изводи и приноси – 2 стр.; Литература – 15 стр. с 242 литературни източници, 3 от които са на български език; Приложение – 3 стр.

Литературният обзор е целенасочено развит с оглед темата на труда. Структуриран е в пет глави, които са насочени към разработваната тема – фоликулогенеза и суперовулация; хранителни добавки/биологично активни вещества и влиянето им върху митохондриите в яйчниците; епигенетично узряване на ооцитите и значение на храни, имащи отношение към качеството на гаметите и развитието на ембрионите. Предоставена е изчерпателна информация относно биологичната активност и състава на изследваната комбинирана биодобавка „Провит Е10 супер“, с което авторката логично мотивира интереса на изследването. Той е насочен към ефекта на биодобавката за подобряване на стандартния протокол на суперовулация с оглед преодоляване известните негативни ефекти върху здравето на хормонално стимулираните женски животни. В литературния обзор дисертантката е акцентирала върху значението на хранителните добавки върху митохондриалния статус (така наречените „митохондриални хранителни вещества“) за подобряване на репродуктивния потенциал на женските животни. Майчините митохондрии

са единственият източник на енергия за развитието на ембриона в първите дни след оплождането преди началото на собствена митохондриална биогенеза. Известно е, че производството на голям брой овоцити е изисква значителна енергия и в този аспект митохондриалният статус на яйчниците е от голямо значение за качеството на женските гамети. Проектирането на проблема върху епигенетичните промени при овоцитното съзряване и връзката с хранителните режими прави разработката на дисертантката актуална и значима. От краткото заключение в края на обзора се изведени целта и трите задачи на дисертационния труд.

Формулирани са две работни хипотези: първата е свързана с доказване на благоприятния ефект на витамин Е и полифеноли, съдържащи се в биодобавката „Провит Е10 супер“, върху митохондриалния статус в яйчниците на суперовулиралите женски мишки; втората хипотеза доказва завършване на де-ново метилирането в овулиралите овоцити в мишките, получавали биодобавката, но това не изключва възможността да останат и такива с незавършено епигенетично репрограмиране, поради преждевременното съзряване на голям брой гамети.

Проведено е оригинално проучване върху ефекта от предварително приемане на биодобавката „Провит Е10 супер“ преди хормонално стимулираната суперовулация върху развитието на фоликулите и овулиралите овоцити в тандем с тяхния митохондриален статус (количество на митохондриалната ДНК, протеинова експресия на митохондриалната НАДН дехидрогеназа 1, генна експресия на митохондриалната ДНК метил трансфераза 1, mtDnmt1) и епигенетична зрялост (генна експресия на ДНК метилиращите ензими – Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b). Трудът е професионално изпълнен с разработване на адекватен експериментален дизайн, включващ три групи животни – контролна, суперовулирала женски мишки по стандартния протокол (инжектиране на PMSG и hCG) и суперовулирала животни, приемали комбинираната биодобавка за 30 дни преди супреовулацията. Приложен е комплекс от съвременни морфометрични, имунохистохимични и молекулярно биологични методи, микроманипулационна техника за изолиране на овоцити, широк набор от статистически методи.

В раздела „Материали и методи“ достатъчно информативно и подробно са описани експерименталните постановки и протоколи. Прилагането на комплексния методологичен подход е довел до получаване на надеждни резултати. Той се изразява в съчетаване на *in vivo* експерименти върху оварилна тъкан и опити върху изолирани овоцити след суперовулация и прием на използваната биодобавка. Проведени са измервания на макропараметри (телесно тегло, общо тегло на репродуктивния тракт и на яйчниците, дължина на матката и на десния и ляв маточен рог) и на микропараметри (брой фоликули и жълти тела в яйчниците и брой овулирала яйцеклетки след суперовулация). Количествено е определена експресията на четири гена от групата на ДНК-метилтрансферазите посредством RT-PCR (total Dnmt1, mtDnmt1, де ново метилиращите Dnmt3a и Dnmt3b). Имунопероксидазен метод е приложен за визуализация на ензима митохондриална НАДН дехидрогеназа 1, който е компонент на дихателната верига и следователно е свързан с генериране на енергия под формата на АТФ. За статистическата обработка на данните е използван специализиран софтуер с широк набор от статистически методи за проверка на статистическа достоверност на разликите между сравняваните групи, както и корелационен анализ.

Успешният протокол на хранене с комбинираната биодобавка „Провит Е10 супер“ е валидирано посредством хроматографски анализ на биоактивните компоненти в добавката и в кръвни проби от третираните женски мишки. Витамин Е се усвоява добре от животните,

доказано със статистическо достоверно почти двукратно повишаване на токоферол ацетата (съдържащ се в комбинираната добавка) в кръвните проби на хранените животни, спрямо нетретираните суперовулирани мишки и контроли.

Раздел „Резултати и дискусия“ е структуриран в четири подраздела, представящи данните от изследванията върху мишки, подложени на хормонална суперовулация с и без прием на комбинираната биодобавка „Провит Е10 супер“. Накратко, резултатите на авторката и тяхният приносен характер могат да се обобщят, както следва:

1. Морфометрични изследвания на макропараметрите не показват статистически достоверни промени в телесното тегло (тенденция на понижение), общото тегло на репродуктивния тракт и на яйчниците (тенденции на повишение). Не се установяват промени в дължината на матката. Скъсяването на маточните рога се установява в двете суперовулирани групи спрямо контролата. Липсата на достоверно скъсяване в групата, приемала добавка спрямо групата, не приемала, показва, че промяната се дължи на хормоналната стимулация, а не на приема на биодобавката. Тези находки на авторката са в унисон с данните от литературата за въздействие на витамин Е върху женски животни.

Тук бих препоръчала да се определят не само абсолютното тегло на репродуктивните органи, но и на относителното, т.е. спрямо телесното тегло. Например, при относителното тегло на яйчниците в групата, приемала биодобавка, се установява по-изразено повишение с 40% спрямо тази, не приемала. При сравнение на абсолютното тегло на яйчниците, повишението е от 17% при прием на биодобавката.

2. Определянето на микропараметри (брой фоликули и жълти тела в яйчниците) показва големи вариации в отделните групи, израз на индивидуална чувствителност у животните спрямо хормоналната стимулация и приема на комбинираната биодобавка. Независимо от това се забелязват следните тенденции – достоверно по-висок брой на вторични и третични фоликули и на жълти тела в групата, приемала биодобавка в сравнение с контролата. Повишението на тези показатели обаче остава недостоверно спрямо суперовулираните животни, не приемали биодобавка, което би могло да мотивира бъдещи по-задълбочени изследвания. По-рядко срещаните случаи на фоликулна атрезия, наблюдавана от дисертантката в групата приемала добавката, е в унисон с литературните данни за ролята на витамин Е в потискане на фоликулната дегенерация и атрезия. По отношение на суперовулацията, приемът на биодобавката повишава достоверно броя на овулираните овоцити с близо 40%, което предполага нейното успешно приложение за повишаване на репродуктивния потенциал на женските животни.
3. Митохондриалният статус е изследван посредством брой копия на митохондриалната ДНК (експресия на единичен митохондриален ген Цитохром В), протеинова експресия на митохондриалната НАДН дехидрогеназа и генната експресия на митохондриалната ДНК метил трансфераза 1 (mtDnmt1). Предвид факта, че най-голям брой митохондрии е установен в зрелите овоцити, авторката логично приема, че достоверното по-ниско количество на мтДНК в яйчниците от двете групи суперовулирани мишки, е косвено доказателство за успешна овулация.

Намирам за интересна оригиналната находката за по-силна експресия на ензима митохондриална НАДН дехидрогеназа в овоцити от яйчници на суперовулирани мишки и особено тези, получавали добавка. Това е показател за прехвърляне функциите за енергийна обезпеченост (синтез на АТФ) от гранулозните клетки на овоцитите, което крие риск за засилено образуване на свободни радикали, способни да атакуват мтДНК.

В този аспект, наличието на антиоксиданти в комбинираната биодобавка би контрирало този процес. Същевременно дисертантката описва за първи път наличие на митохондриален изомер на Dnmt1 (mtDnmt1) в овоцити. Съответно, тя представя оригинални данни за по-високи нива на метилиране на мтДНК, предполагащи негативна регулация на генната експресия на ензимите от дихателната верига, което от своя страна е защитен механизъм срещу повишената митохондриална активност вследствие на хормоналното стимулиране и приема на биодобавката.

От друга страна, авторката установява втори - противоположен механизъм за „безопасна“ енергийна обезпеченост, включващ гранулозните клетки. Това е тенденцията за повишение на мтДНК в кумулусните клетки на овулиралите овоцити, която вероятно да компенсира по-слабата експресията на НАДН дехидрогеназата в групата, приемала биодобавката.

Така получените и анализирани данни потвърждават хипотезата за благоприятното влияние на комбинираната биодобавка „Провит Е10 супер“ върху функцията на митохондриите в яйчниците и предвид стимулиращият ефект върху фоликулогенезата и овулацията, тя може да бъде прилагана за по-добри и по-успешни протоколи за суперовулация.

4. Изследванията върху генната експресия на ДНК метилиращите ензими (Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b) предоставят нови данни с принос към изясняване на спорния въпрос за епигенетичната зрялост на овоцитите, получени след суперовулация. По-ниските стойности на Dnmt1 в двете суперовулирали групи (с и без прием на добавка) предполагат завършено метилиране на генома към момента на овулация. Съответно, по-високите стойности на Dnmt1 в контролата са логични, предвид наличието на множество незрели овоцити, събрани чрез дисекция на яйчника. По-високите стойности, макар и недостоверно, при прием на биодобавка се обясняват със значително по-големият брой на овулирали овоцити в сравнение без добавка. За това е възможно, при по-високия добив, не всички овоцити да са завършили процеса на метилиране. По-високите стойности, макар и недостоверни, на де-ново метилиращите ензими, Dnmt3a и Dnmt3b, след хормонална стимулация и прием на добавка, са още едно потвърждение за метилиращата активност в тези овоцити.

Направеният от дисертантката корелационен анализ установява тесни корелации между експресията на метилиращите ензими. Установяват се промени в знака на корелация (положителна/отрицателна) при хормонално третиране и прием на добавка, което предполага включване на компенсаторни механизми на регулацията на експресията на ДНК метилтрансферазите.

Дискусията завършва със „Заклучение“, в което авторката е акцентирала на най-важните и същевременно най-неясни въпроси, по които тя е предоставила експериментални данни и е очертала перспективи за бъдещи изследвания. Например, пренасочване на митохондриалната активност от гранулозните клетки към овоцита и разширяване на изследванията върху кумулусните клетки, които са най-достъпният материал за отчитане качеството на овоцити в хуманната медицина. Регистрираната транскрипция на гени в овулирали овоцити, отговорни за метилирането на ДНК, поражда необходимостта от продължаване на изследванията върху епигенетичното репрограмане на овоцитите, съзряващи в условия на хормонална намеса, съчетана с биодобавка.

Като критична бележка отбелязвам наличието на правописни, граматични и стилови грешки, които не намаляват значимостта и приносната същност на труда.

Дисертационният труд е онагледен с 17 таблици и 43 фигури, от които 11 схеми, 19 графики, 3 микрофотографии и 10 пана с общо 33 микроскопски снимки .

Изводите от 6, формулирани кратко и ясно. Изведени са 5 приноса - 1 потвърдителен, 3 оригинални и 1 приложен принос – препоръка за подобряване на протокола за суперовулация при лабораторни животни и за приложение на „Провит Е10 супер“ при подхранване на селскостопанските животни.

Авторефератът е достатъчно информативен и представя в синтезиран вид есенцията на труда.

Във връзка с дисертацията се публикувани 3 статии, едната в списание с SJR. Представени са девет участия в научни форуми – едно в международен форум у нас и осем в национални научни мероприятия.

Заклучение: Обемът и качеството на проведеното комплексно морфометрично и молекулярно-биологично изследване определят дисертационния труд на Ваня Младенова, като завършена и прецизно осъществена научна разработка с ясно изразено приложно значение за репродуктивната биология и ветеринарно-медицинската практика. Представените данни доказват благоприятния ефект на комбинираната биодобавка „Провит Е10 супер“ върху функцията на митохондриите в яйчниците, с резултат по-активна фоликулогенезата и овулация. Поради това, биодобавката може да бъде прилагана за по-успешен и качествен добив на овоцити след суперовулация. Обемът и качеството на труда, заедно с успешното изпълнение на образователната и научна програма на Центъра за обучени при БАН, напълно покриват критериите на ЗРАС на РБ (обн., ДВ, бр. 38 от 2010 г.; изм., бр. 101 от 2010 г. и бр. 68 от 2013 г.) и съответните правилници за неговото приложение. С придобитите знания и умения Ваня Младенова е изграден учен, способен за самостоятелна научно-изследователска работа. Във връзка с горе-изложеното, убедено давам положителна оценка на дисертационния труд на тема „Проучване върху митохондриалния статус в яйчници и епигенетични маркери в ооцити на суперовулирани мишки, получавали комбинирана биодобавка” и препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват „ЗА” присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Ваня Младенова.

29.09.2019 г.

Рецензент:

/проф. Нина Атанасова, дбн/